

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 9 月 27 日 (27.09.2001)

PCT

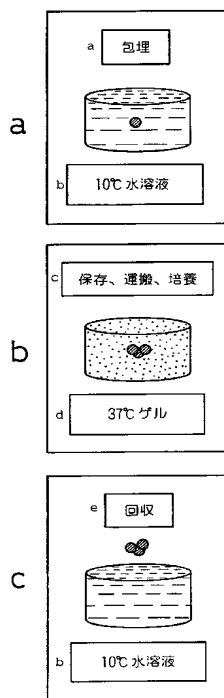
(10) 国際公開番号  
WO 01/70022 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A01N 1/02, C12N 5/00, G01N 33/48, 1/28
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/02241
- (22) 国際出願日: 2001 年 3 月 21 日 (21.03.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2000-83277 2000 年 3 月 21 日 (21.03.2000) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 森 有一 (MORI, Yuichi) [JP/JP]; 〒236-0045 神奈川県横浜市金沢区釜利谷南3-21-2-4 Kanagawa (JP). 窪田 倭 (KUBOTA, Sunao) [JP/JP]; 〒186-0002 東京都国立市東3丁目21-24 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉岡 浩 (YOSHIOKA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒257-0026 神奈川県秦野市下落合11-1 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: COATING MATERIALS FOR BIOLOGICAL TISSUES, COATED BIOLOGICAL TISSUES AND METHOD OF COATING BIOLOGICAL TISSUES

(54) 発明の名称: 生物体組織用被覆材、生物体組織の被覆体、および生物体組織の被覆法



(57) Abstract: Coating materials for biological tissues which make it possible to preserve biological tissues over a long period of time; coated biological tissues with the use of the materials; and a method of coating biological tissues. A biological tissue is coated by using a coating material which contains at least a hydrogel-forming polymer and shows heat-reversible sol/gel transfer, i.e., being in the state of a sol at lower temperatures and setting to gel at higher temperatures. Thus a ratio  $A_2/A_0$  (wherein  $A_0$  represents the cell survival ratio of the biological tissue immediately before the coating, and  $A_2$  represents the cell survival ratio of the biological tissue 2 days after the coating) of 20% or more can be easily established.

a... EMBEDDING  
b... AQUEOUS SOLUTION AT 10°C  
c... PRESERVATION, TRANSPORTATION, INCUBATION  
d... GEL AT 37°C  
e... RECOVERY

[続葉有]



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

生物体組織を長期間保存することが可能な生物体組織用被覆材、およびそれを用いる生物体組織被覆体、および生物体組織の被覆法。ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含み、且つより低温でゾル状態、より高温でゲル化する熱可逆的なゾル-ゲル転移を示す被覆材を用いて、生物体組織を被覆する。前記被覆材による被覆直前の生物体組織中の細胞の生存率 ( $A_0$ ) と、該被覆 2 日後の該組織中の細胞の生存率 ( $A_2$ ) との比 ( $A_2/A_0$ ) として 20% 以上が容易に得られる。

## 明 細 書

生物体組織用被覆材、生物体組織の被覆体、および生物体組織の被覆法

### 技術分野

本発明は、生物体に由来する（例えば、所定数の生細胞を含む）組織ないし組織片を良好に被覆および／又は保存するために好適に使用可能な被覆材、およびそれを用いた被覆体および被覆法に関する。

本発明の被覆材ないし被覆方法は、例えば、手術等で切除、摘出したヒト等の生物体の組織を良好に被覆および／又は保存するために特に好適に使用可能である。

本発明の被覆材ないし被覆方法は、生物体の組織を、その活性低下および／又は損傷を出来る限り抑制しつつ、保存ないし運搬する目的でも好適に利用可能である。

本発明の被覆材ないし保存方法を用いて被覆ないし保存されたヒト組織は好適な細胞活性の維持が容易であるため、例えば、薬剤等の効果および副作用の高感度測定にも好適に使用可能である。

更に、本発明の被覆材または被覆方法を用いて被覆ないし保存されたヒト組織から分離された細胞は、その細胞活性に基づきバイオテクノロジー的な使用法（例えば、ハイブリドーマまたはワクチンの製造）にも好適に利用可能である。また、本発明の被覆材ないし被覆方法を用いて被覆ないし保存されたヒト組織から分離された生物由来の材料（例えば、蛋白質、RNAまたはDNA）は、その解析に基づき、種々の基礎データ（例えば、疾患の診断または遺伝子治療等に必要な基礎データ）の集積にも好適に利用可能である。

## 背景技術

従来より、生物体細胞の被覆法としては、凍結保存法が最も一般的に行われてきた。この凍結保存法においては、凍結保護剤としてグリセリン、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ショ糖、ポリビニルピロリドン等を用いて細胞を徐冷凍結させ、最終的には該細胞を液体窒素中で保存する。

他方、このように凍結保存した細胞を融解するためには、40℃温浴中で該凍結物を振盪して、急速に解凍する方法が一般的に行われてきた。この急速解凍において融解速度が遅い場合には、細胞内に生じた氷が再結晶化し、細胞構造を破壊して、細胞の生存率が著しく低下する。

上述した凍結保護剤のうち、ショ糖、ポリビニルピロリドンはその性能が低いため、現在ではグリセリンまたはDMSOが一般的に使用されている。しかしながら、グリセリンは、細胞内に浸透するまでに比較的長い時間がかかるという問題がある。また、DMSOは37℃では細胞に大きな障害を与えるために、融解時に遠心によって除去する必要があるため操作が煩雑であり、加えて、凍結保護剤たるDMSO自体がその毒性により細胞生存率の低下をもたらすという問題が未解決である。

特に、生物体組織を構成する接着依存性細胞（例えば、線維芽細胞）の場合には、凍結保存によって基質接着率が著しく低下するという重大な問題点がある。

一方、上記した凍結保存法とは別に、低温保存法も開発されている。この低温保存法においては、10～20℃または2～6℃の比較的低い温度で細胞の物質代謝を低下させることによって細胞の増殖速度を遅延させ、培養液の交換や継代の回数を少なくして保存する方法である。

しかしながら、上記した凍結保存法および低温保存法のいずれの場合にも、保存すべき細胞の生存率の顕著な低下は不可避であり、加えて、長期的な保存も不可能である。

一方、生物体組織（ないし生物体組織片）の保存法に関しては、該組織中の細胞の生存率を高く維持した状態で長期間保存することは、従来より不可能とされて来た。

このような生物体組織の凍結保存が困難であるのは、生物体組織は、通常は細胞と、コラーゲンを主成分としたExtracellular Matrix（ECM）とからなっているため、1）DMSO、グリセリン等の凍結保護剤がECM中に浸透して生物体組織内部の細胞に到達することが困難であること；2）凍結組織を融解する際に、細胞と比較して著しく大きい“かたまり”である凍結組織の内部を急速に融解することが難しく、上述したように、氷の再結晶化により細胞生存率が著しく低下してしまうこと等によるものと考えられている。

他方、生物体組織の凍結保存が困難であるため、生物体組織を保存する際には、上述した細胞保存の場合と同様に、組織を低温の培養液または保存液中に直接に浸漬し、細胞の物質代謝を低下させて保存する方法（低温保存法）が最も一般的に行われている。しかしながら、「細胞」保存の場合と同様に、生物体組織中の細胞の生存率の大きな低下は不可避であり、またこの方法による2、3日以上 of 長期保存も困難であった。

## 発明の開示

本発明の目的は、上記した従来技術の欠点を解消した生物体組織用被覆材、生物体組織の被覆体、および生物体組織の被覆法を提供することにある。

本発明の更なる目的は、生物体組織を長期間保存することが可能

な生物体組織用被覆材、およびそれを用いる生物体組織被覆体、および生物体組織の被覆法を提供することにある。

本発明者らは鋭意研究の結果、より低温でゾル状態、より高温でゲル化するゾルーゲル転移温度を有し、且つ該ゾルーゲル転移が熱可逆的なハイドロゲル形成性の高分子を用いて生物体組織用被覆材を構成することが、上記目的の達成のために極めて効果的であることを見出した。

本発明の生物体組織用被覆材は上記知見に基づくものであり、より詳しくは、ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含む生物体組織用被覆材であって；該被覆材が低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示し、且つ、前記被覆材による被覆直前の生物体組織中の細胞の生存率（ $A_0$ ）と、該被覆2日後の該組織中の細胞の生存率（ $A_2$ ）との比（ $A_2/A_0$ ）として20%以上を与えることを特徴とするものである。

本発明によれば、更に、ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含む生物体組織用被覆材であって；該被覆材が低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示し、且つ、該被覆材による被覆直前の生物体組織片中の細胞の生存率（ $A_0$ ）と、該被覆7日後の該組織片中の細胞の生存率（ $A_7$ ）との比（ $A_7/A_0$ ）として5%以上を与えることを特徴とする生物体組織用被覆材が提供される。

本発明によれば、更に、ハイドロゲル形成性の高分子を含み、且つ低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示す被覆材を含む溶液を、該ゾルーゲル転移温度より低い温度でゾル状態とし；

生物体組織に、該ゾル状態の被覆材を塗布し、

該被覆材をゾルーゲル転移温度より高い温度でゲル化させて前記

生物体組織を被覆することを特徴とする生物体組織の被覆方法が提供される。

本発明によれば、更に、生物体組織と、

該生物体組織の周囲に配置された被覆材とを少なくとも含む生物体組織の被覆体であって；

該被覆材が、ハイドロゲル形成性の高分子を含み、低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示し；且つ、該被覆材による被覆直前の生物体組織中の細胞の生存率（ $A_0$ ）と、該被覆 2 日後の該組織中の細胞の生存率（ $A_2$ ）との比（ $A_2/A_0$ ）が 20 % 以上であることを特徴とする生物体組織の被覆体を提供される。

本発明によれば、更に、生物体組織と、

該生物体組織の周囲に配置された被覆材とを少なくとも含む生物体組織の被覆体であって；

該被覆材が、ハイドロゲル形成性の高分子を含み、低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示し；且つ、該被覆材による被覆直前の生物体組織中の細胞の生存率（ $A_0$ ）と、該被覆 7 日後の該組織片中の細胞の生存率（ $A_7$ ）との比（ $A_7/A_0$ ）が 5 % 以上であることを特徴とする生物体組織の被覆体を提供される。

本発明者の知見によれば、本発明の被覆材を構成する高分子に基づくハイドロゲルは、疎水結合を架橋の少なくとも一部に利用していると推定される。このため、該被覆材は、1) ゾルーゲル転移温度より低い温度ではゾル（溶液）状態、該転移温度より高い温度ではゲル状態を示し、且つ、該ゾルーゲル転移は熱可逆的である。更に、2) ゾルーゲル転移温度より高い温度では、被覆材の内部に疎水性領域が形成されて、疎水性生理活性物質を該領域に吸着、固定

化することが可能である。加えて、3) ゴルゲル転移温度より高い温度で形成される被覆材に基づくゲルは、被被覆体たる生物体組織の速い動作（すなわち、より高い周波数を有する動作）に対しては固体として、該組織の遅い動作（すなわち、より低い周波数を有する動作）に対しては液体として、それぞれ振舞うという特徴がある。従って、被覆ないし保存中の生物体組織の形態変化に対して、本発明の被覆材の形状は良く追従でき、その結果、該被覆材は生物体組織に対して良好な密着性を維持できる。

これに対して、従来より細胞・組織培養に使用されてきた寒天ゲル（正の温度－溶解度変化を示す）は、架橋が主として結晶化構造によって形成されているため、結合エネルギーが高くゲルがゾルに転移する温度は約 95℃で生理的溫度範囲（通常は 0℃～40℃）よりも著しく高いため、熱可逆的な生物体組織の被覆材としては使用できない。

従来のアルギン酸ゲル（正の温度－溶解度変化を示す）の場合は、架橋がイオン結合によって形成されているために結合エネルギーが高く、生理的条件下でゲルをゾルに転移させることは困難であり、熱可逆的な生物体組織の被覆材としては使用できない。

更に、従来のコラーゲン、ゼラチンゲル（いずれも、正の温度－溶解度変化を示す）の場合は架橋が結晶化構造、或いはイオン結合によって形成されているためにゲルをゾル化するためにコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ等の酵素を必要とする。したがって、生理的条件下（コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ等の使用は生物体組織に酵素反応による損傷を与える）で保存組織を回収することが困難である。換言すれば、これらのコラーゲン、ゼラチンゲルは、熱可逆的な生物体組織の被覆材としては使用できない。

また、上記した従来のハイドロゲルは主として親水性高分子から



形成されていて、本発明の被覆材のように疎水性生理活性物質（薬剤、その他）を吸着、固定化することが困難である。更に、上記の従来のハイドロゲルの架橋は結合エネルギーの高い結晶化構造、イオン結合等によって形成されているため、速い動作のみならず遅い動作に対しても固体として振舞う。したがって、保存生物体組織の形態変化にこれら従来のハイドロゲルの形状は追従することができず、該生物体組織と該ハイドロゲルの間に間隙が発生して、優れた密着性ないしはこれに基づく保存組織の活性の長期間保持の達成は困難である。

（被覆・回収の推定メカニズム）

上記構成を有する本発明の生物体組織用被覆材が効果的な被覆・回収を達成できる理由は、本発明者の知見によれば、以下のように推定される。

一般に、生物体組織中では、１）細胞の接着の足場となる細胞外マトリックス（Extracellular Matrix、ECM）により細胞の発生、極性および行動等の制御が行われている。２）異種または同種の細胞間のコミュニケーションにより細胞の発生、成長、分裂等の細胞の多様な活性の制御が行われている。

上記１）のECMは、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン等の繊維形成タンパクが三次元ネットワーク構造を形成するグリコサミノグリカン鎖からなるハイドロゲル中に埋め込まれた構造をしている。生物体組織はECMのハイドロゲル中に線維芽細胞等の細胞が埋め込まれた結合組織と、ECMのハイドロゲルの上に接着した上皮または内皮系細胞からなる基底膜組織とに大別される。細胞と接触したECMのハイドロゲルが血液と細胞間での栄養分、代謝物、ホルモンの拡散を可能にしている。

他方、上記２）の細胞間のコミュニケーションは、細胞が化学仲

介物質 (chemical mediator) を分泌し、ある距離を隔てた細胞にシグナルを伝えることによって行われている。

上記の化学伝介物質としては、1) 細胞のごく近傍でしか作用しない局所性化学伝介物質 (local chemical mediator)、2) 神経細胞から分泌され有効作用距離がごく短い神経伝達物質 (neurotransmitter)、3) 内分泌細胞から分泌され血流等を通じて全身の標的細胞に作用するホルモン (hormone) 等が挙げられる。

この1) の局所性化学伝介物質としては、神経細胞成長因子等のタンパク、走化性因子等のペプチド、ヒスタミン等のアミノ酸誘導体、プロスタグランジン等の脂肪酸誘導体等が挙げられる。

上記2) の神経伝達物質としては、グリシン等のアミノ酸、ノルアドレナリン、アセチルコリン、エンケファリン等の低分子ペプチド等の低分子量物質が挙げられる。

上記3) のホルモンとしては、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor、FGF) 上皮細胞成長因子 (epithelial growth factor、EGF)、血管内皮細胞成長因子 (vascular endothelial growth factor、VEGF) 等の細胞成長因子、インスリン、ソマトトロピン、ソマトメジン、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、副甲状腺ホルモン (PTH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 等のタンパク、または糖タンパク、TSH放出因子、バソプレシン、ソマトスタチン等のアミノ酸誘導体、コルチゾール、エストラジオール、テストステロン等のステロイド等が挙げられる。

生物体組織からコラーゲン分解酵素等を用いて細胞外マトリックス (ECM) を酵素分解し抽出分離された細胞の活性または多様な機能が、組織中の細胞に比較して著しく低下することは良く知られている。この低下の原因として、抽出分離過程で使用するコラーゲン分解酵素等が細胞にダメージを与えることも考えられるが、主

として、１）細胞の活性および機能発現に重要なＥＣＭが消失してしまうこと、２）ＥＣＭを介して行われる種々の化学仲介物質による細胞間コミュニケーションが不可能になることによるものと考えられている。

従って、細胞の活性および機能を高い状態で長期間保存するためには、抽出分離した孤立細胞の状態よりも生物体組織として保存することが好ましいと考えられる。

一方、ＥＣＭに接触した複数の細胞から成る生物体組織は、孤立した細胞と比較して当然のことながら大きな形態を有している。外部からの単純な拡散過程による細胞への栄養物の供給、または細胞が産生する老廃物の効率の良い除去のためには、出来るだけ生物体組織を小さくすることが好ましい。その大きさとしては血流中の栄養素の細胞への供給および細胞老廃物の血流による除去が毛細血管と細胞の間のＥＣＭ（距離が $200 \sim 300 \text{ m}\mu$ ）を介しての単純拡散過程によって行われていることを考えると $400 \sim 600 \text{ m}\mu$ 程度が適当であると考えられる。ここで生物体組織を一辺の長さが $L$ の立方体と考えると立方体の面積（ $S$ ）と体積（ $V$ ）との比（ $S/V$ ）は次式で表わされる。

$$S/V = 6L^2/L^3 = 6/L$$

即ち、単位体積あたりの表面積（ $S/V$ ）は組織の大きさに逆比例し組織を細切すればする程 $S/V$ は増大することになる。即ち組織の栄養供給および老廃物除去を効率よく行くと該組織の単位体積当たりの表面積が増大し、表面から該組織中のＥＣＭまたは上記した化学仲介物質が失われ易くなってしまう。上述したようにＥＣＭはコラーゲン等の繊維形成タンパクがグリコサミノグリカン分子の三次元網目構造の中に埋め込まれたハイドロゲルからなっていて比較的、水に不溶であるのに対して細胞間コミュニケーションを司る

化学仲介物質はプロスタグランジン、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン等の疎水性物質を除いてタンパク、糖タンパク、ペプチド等大部分は水溶性である。従って、従来の生物体組織の保存法のように細切された生物体組織を保存液または培養液中に浸漬して保存すると細胞間コミュニケーションに不可欠な化学仲介物質の大部分は容易に組織から保存液または培養液中に散逸してしまう。即ち細胞の活性および機能維持に重要な役割を担っている細胞間コミュニケーションが不可能になり非常に短期間（2～3日間）の内に細胞の生存率或いは機能が低下してしまう。この現象は身体の一部が切断されたときに切断面からの出血現象と酷似していて、止血するためにwound dressingによって切断面を被覆することが日常的に行われている。そこで本発明において生物体組織からのECMをはじめとした化学仲介物質の保存液中への散逸を防止するためにwound dressingによって該組織を被覆する方法が開発された。本発明の生物体組織用被覆材には下記の特徴が要求される、1）生物体組織中に含まれているECMをはじめとした種々の化学仲介物質の保存液中への散逸を防止するものの該被覆材は比較的低分子量の栄養素および細胞が産生する老廃物の通過の障害になってはならない。

上述したように、タンパクまたは糖タンパクから成る高分子量の各種の細胞成長因子、各種のホルモン類の組織からの散逸を防止しかつ各種のアミノ酸、酸素等の栄養素および老廃物等の低分子量物質の通過を阻害しないような被覆材としては三次元網目構造を有するハイドロゲルが最適である。2）上述したようにプロスタグランジン、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン等の低分子量の疎水性化学仲介物質の組織からの散逸を阻止するには上記の三次元網目構造を有するハイドロゲル中に充分量の疎水性部分が存在することが不可欠である。

3) 非常に柔軟な生物体組織と同等の機械的物性を有するのみならず保存中の組織の形態変化に追従し被覆材の形態が変化し密着性の低下と組織または被覆材剤の破損等を起こさないこと、等である。上記の物性を獲得するためには上記のハイドロゲルの三次元網目構造の架橋点結合が強すぎないことが不可欠である。一般的にハイドロゲルの三次元網目の架橋点の結合エネルギーを $\Delta F$ とすると、架橋点の寿命 ( $\tau$ ) は次式で表される。

$$\tau = \tau_0 \cdot \exp(\Delta F / K T)$$

ここで架橋点寿命が $\tau$ の三次元網目構造を有するハイドロゲルの場合は、 $1 / \tau$  ( $\text{s e c}^{-1}$ ) よりも高い周波数を有する動作に対しては該ハイドロゲルの架橋点は結合した状態、即ち、架橋構造体として対応し、 $1 / \tau$  ( $\text{s e c}^{-1}$ ) よりも低い周波数を有する動作に対しては該ハイドロゲルの架橋点は非結合の状態、即ち、架橋構造を有さない液体として対応する。これは該ハイドロゲルは非常に速い動作に対しては固体として、非常にゆっくりした動作に対しては液体としてそれぞれ振舞うことを意味している。これは該ハイドロゲルで被覆した組織を保存時に移動する、或いは運搬する際に生ずる動作（通常、動きの周波数は高く、約  $10^{-2} \text{ s e c}^{-1}$  オーダーを越える）に対しては該ハイドロゲルは固体として振舞い、上述したように生物体組織からのECMをはじめとした化学仲介物質の保存液中への散逸を阻止する。

一方、該ハイドロゲルは保存期間中に組織が徐々に収縮、或いは膨脹し形態変化を生ずるような周波数の低い、約  $10^{-4} \text{ s e c}^{-1}$  オーダーより小さいゆっくりした動作に対しては液体として振舞う。従って、該ハイドロゲルは組織の形態変化に良く追従し、組織と該被覆材間の密着性を良好に保持するばかりでなく組織の寸法変化による該組織、或いは該被覆材の破損を防止する。

上記のような性質を有する三次元網目構造を形成する架橋点の結合エネルギーとしては生理的溫度範圍（ $0^{\circ}\text{C} \sim 40^{\circ}\text{C}$ ）における熱エネルギー（ $RT$ ）と同等度であることが好ましく、数十～数百  $\text{kcal/mol}$  と結合エネルギーの高い共有結合、結晶化構造、イオン結合による架橋構造によって形成される三次元網目構造体は本発明の被覆材としては不適であり、数  $\text{kcal/mol}$  の結合エネルギーを有する分散力による結合、水素結合或いは疎水結合による三次元網目構造体は本発明の被覆材として好適に使用可能である。

特に、上述したように疎水性化学仲介物質の組織からの散逸を防止する意味で該被覆材の三次元網目構造が疎水結合による架橋点により形成されていることが好ましい。更に、疎水結合によって形成される三次元網目構造体、即ちハイドロゲルは、疎水結合は温度の上昇と共に強くなるという性質を有するために、低温でゾル、高温でゲル化する。従って、他の結合、例えば水素結合、分散力等による結合を利用したハイドロゲルとは転移の温度依存性が逆になる。疎水性結合を利用したハイドロゲルの物性は、生物体組織、或いは細胞を低温ゾル状態で包埋することができるため、包埋時の熱的損傷を回避できるという点で従来のハイドロゲルよりも本発明の被覆材としては好適に使用可能である。更に、疎水性結合を利用したハイドロゲルの転移は熱的に可逆的であるため、該ゲルに包埋した組織から該ゲルを除去する際にも低温でゲルを溶解でき、容易に且つ組織に熱的損傷を与えることなく該ゲルから保存組織を回収することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

図1（a）、図1（b）および図1（c）は、本発明の被覆材を用いて生物体組織の包埋、培養、および回収を行う方法の一例を示

す模式斜視図である。

図 2 は、種々のゾルーゲル転移温度を有する本発明の被覆材の、温度変化に基づく粘度の変化の一例を示すグラフである。

図 3 は、大腸癌の原発巣を示す光学顕微鏡写真（100倍像）である。

図 4 は、大腸癌の培養 14 日後を示す光学顕微鏡写真（100倍像）である。

図 5 は、大腸癌組織の 7 日培養後を示す光学顕微鏡写真（100倍像）である。

図 6 は、大腸癌組織の 7 日培養後を示す光学顕微鏡写真（200倍像）である。

図 7 は、大腸正常組織の 7 日培養後を示す光学顕微鏡写真（100倍像）である。

図 8 は、大腸正常組織の 7 日培養後を示す光学顕微鏡写真（200倍像）である。

発明を実施するための最良の形態

以下、必要に応じて図面を参照しつつ本発明を更に具体的に説明する。以下の記載において量比を表す「部」および「%」は、特に断らない限り質量基準とする。

（被覆）

本発明において、「被覆」とは、生物体組織の少なくとも一部を、被覆材で覆うことを言う。本発明の被覆材の効果を効率的に発揮可能な点からは、被覆されるべき生物体組織の全表面積（ $S_t$ ）と、被覆材で被覆された生物体組織の表面積（ $S_c$ ）との比（ $S_c/S_t$ ）は、50%以上であることが好ましく、更には70%以上、特に90%以上であることが好ましい。この比（ $S_c/S_t$ ）が実質的

に 100%であることが最も好ましい。

本発明において、被覆材で覆われた生物体組織の状態、態様等は特に制限されない。すなわち、例えば後述する図 1 (b) に模式的に示すように、被覆材を含むゲル中に生物体組織が浮遊ないし包埋されていてもよい。このようにゲル中に生物体組織が浮遊ないし包埋された状態は、該組織の容器壁および／又は組織同士の接触・衝突に基づく組織の破損・障害等が効果的に防止できるため、組織の保存および／又は運搬に特に好適である。

(生物体組織用被覆材)

本発明の生物体組織用被覆材は、ゾルーゲル転移温度を有するハイドロゲル形成性の高分子を含み、該被覆材はより低い温度でゾル状態、より高い温度でゲル化する熱可逆的なゾルーゲル転移を示す。

(ゾルーゲル転移温度)

本発明において「ゾル状態」、「ゲル状態」および「ゾルーゲル転移温度」は以下のように定義される。この定義については文献 (Polymer Journal. 18 (5), 411~416 (1986)) を参照することができる。ゾル状のハイドロゲル 1 mL を内径 1 cm の試験管に入れ、所定の温度 (一定温度) とした水浴中で 12 時間保持する。この後、試験管の上下を逆にした場合に、溶液／空気の界面 (メニスカス) が溶液の自重で変形した場合 (溶液が流出した場合を含む) には、上記所定温度においてハイドロゲルは「ゾル状態」とであると定義する。一方、上記試験管の上下を逆にしても、上記した溶液／空気の界面 (メニスカス) が溶液の自重で変形しない場合には、該ハイドロゲルは、上記所定温度において「ゲル状態」とであると定義する。一方、上記測定において、濃度が例えば約 3 質量 % のゾル状のハイドロゲル (溶液) を用い、上記した「所定温度」



を徐々に（例えば 1℃きざみで）上昇させて「ゾル状態」が「ゲル状態」に転移する温度を求めた場合、これによって求められる転移温度を「ゾルーゲル転移温度」と定義する（この際、「所定温度」を例えば 1℃きざみで下降させ、「ゲル状態」が「ゾル状態」に転移する温度を求めてもよい）。

本発明においては、生物体組織の熱的損傷を防ぐ点からは、上記ゾルーゲル転移温度は 0℃より高く、45℃以下であることが好ましく、更には、0℃より高く 42℃以下（特に 4℃以上 40℃以下である）ことが好ましい。

このような好適なゾルーゲル転移温度を有するハイドロゲルは、後述するような具体的な化合物の中から、上記したスクリーニング方法（ゾルーゲル転移温度測定法）に従って容易に選択することができる。本発明の被覆材を用いて生物体組織を保存、および／又は回収するという一連の操作においては、上記したゾルーゲル転移温度（ $a^{\circ}\text{C}$ ）を保存時の温度（ $b^{\circ}\text{C}$ ）と、回収するための冷却時の温度（ $c^{\circ}\text{C}$ ）との間に設定することが好ましい。すなわち、上記した 3種の温度  $a^{\circ}\text{C}$ 、 $b^{\circ}\text{C}$ 、および  $c^{\circ}\text{C}$ の間には、 $b > a > c$ の関係があることが好ましい。より具体的には、 $(b - a)$ は 1～40℃、更には 2～30℃であることが好ましく、また  $(a - c)$ は 1～40℃、更には 2～30℃であることが好ましい。

（被覆材の動作に対する追従性）

本発明の被覆材に基づくハイドロゲルは、その生物体組織の保持性と、該組織の形態変化への追従性のバランスの点から、より高い周波数に対しては固体的な挙動を示し、他方、より低い周波数に対しては液体的な挙動を示すことが好ましい。より具体的には、該ハイドロゲルの動作に対する追従性は以下の方法で好適に測定することが可能である。

（動作に対する追従性の測定方法）

ハイドロゲル形成性の高分子を含む本発明の被覆材（ハイドロゲルとして 1 m L）をゾル状態（ゾルーゲル転移温度より低い温度）で内径 1 c m の試験管に入れ、該被覆材のゾルーゲル転移温度よりも充分高い温度（たとえば該ゾルーゲル転移温度よりも約 1 0 °C 高い温度）とした水浴中で上記試験管を 1 2 時間保持し、該ハイドロゲルをゲル化させる。

次いで、該試験管の上下を逆にした場合に溶液／空気の界面（メニスカス）が溶液の自重で変形するまでの時間（T）を測定する。ここで  $1/T$ （s e c<sup>-1</sup>）より低い周波数の動作に対しては該ハイドロゲルは液体として振舞い、 $1/T$ （s e c<sup>-1</sup>）より高い周波数の動作に対しては該ハイドロゲルは固体として振舞うことになる。本発明のハイドロゲルの場合には T は 1 分～2 4 時間、好ましくは 5 分～1 0 時間である。

（定常流動粘度）

本発明の被覆材に基づくハイドロゲルのゲル的性質は、定常流動粘度の測定によっても好適に測定可能である。定常流動粘度  $\eta$ （イータ）は、例えばクリープ実験によって測定することができる。

クリープ実験では一定のずり応力を試料に与え、ずり歪の時間変化を観測する。一般に粘弾性体のクリープ挙動では、初期にずり速度が時間とともに変化するが、その後ずり速度が一定となる。この時のずり応力とずり速度の比を定常流動粘度  $\eta$  と定義する。この定常流動粘度は、ニュートン粘度と呼ばれることもある。ただし、ここで定常流動粘度は、ずり応力にほとんど依存しない線形領域内で決定されなければならない。

具体的な測定方法は、測定装置としてストレス制御式粘弾性測定装置 C S L 型レオメーター（C S L 5 0 0、米国キャリーメド社製

）を、測定デバイスにアクリル製円盤（直径 4 c m）を使用し、試料厚み 6 0 0  $\mu$  m として少なくとも 5 分間以上の測定時間クリープ挙動（遅延曲線）を観測する。サンプリング時間は、最初の 1 0 0 秒間は 1 秒に 1 回、その後は 1 0 秒に 1 回とする。

適用するずり応力（ストレス）の決定にあたっては、1 0 秒間ずり応力を負荷して偏移角度が  $2 \times 10^{-3}$  r a d 以上検出される最低値に設定する。解析には 5 分以降の少なくとも 2 0 以上の測定値を採用する。本発明の被覆材に基づくハイドロゲルは、そのゾルーゲル転移温度より約 1 0  $^{\circ}$  C 高い温度において、 $\eta$  が  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6$  P a  $\cdot$  s e c であることが好ましく、更には  $8 \times 10^3 \sim 2 \times 10^6$  P a  $\cdot$  s e c、特に  $1 \times 10^4$  P a  $\cdot$  s e c 以上、 $1 \times 10^6$  P a  $\cdot$  s e c 以下であることが好ましい。

上記  $\eta$  が  $5 \times 10^3$  P a  $\cdot$  s e c 未満では短時間の観測でも流動性が比較的高くなり、ゲルによる生物体組織の被覆・固着の困難性が増大する。他方、 $\eta$  が  $5 \times 10^6$  P a  $\cdot$  s e c を超えると、長時間の観測でもゲルが流動性をほとんど示さなくなる傾向が強まり、生物体組織の動きに追従することの困難性が増大する。また、 $\eta$  が  $5 \times 10^6$  を超えるとゲルが脆さを呈する可能性が強まり、わずかの純弾性変形の後、一挙にもろく破壊する脆性破壊が生起しやすい傾向が強まる。

#### （動的弾性率）

本発明の被覆材に基づくハイドロゲルのゲルの性質は、動的弾性率によっても好適に測定可能である。該ゲルに振幅  $\gamma_0$ 、振動数を  $\omega / 2 \pi$  とする歪み  $\gamma(t) = \gamma_0 \cos \omega t$  ( $t$  は時間) を与えた際に、一定応力を  $\sigma_0$ 、位相差を  $\delta$  とする  $\sigma(t) = \sigma_0 \cos(\omega t + \delta)$  が得られたとする。  $|G| = \sigma_0 / \gamma_0$  とすると、動的弾性率  $G'(\omega) = |G| \cos \delta$  と、損失弾性率  $G''(\omega) = |G|$

$|\sin \delta$  との比  $(G''/G')$  が、ゲルの性質を表す指標となる。

本発明の被覆材に基づくハイドロゲルは、 $\omega/2\pi = 1 \text{ Hz}$  の歪み（速い動作に対応する）に対しては固体として挙動し、且つ、 $\omega/2\pi = 10^{-4} \text{ Hz}$  の歪み（遅い動作に対応する）に対しては固体として挙動する。より具体的には、発明の被覆材に基づくハイドロゲルは、以下の性質を示すことが好ましい（このような弾性率測定の詳細については、例えば、文献：小田良平ら編集、近代工業化学 19、第 359 頁、朝倉書店、1985 を参照することができる）。

$\omega/2\pi = 1 \text{ Hz}$ （ゲルが固体として挙動する振動数）の際に、 $(G''/G')_s = (\tan \delta)_s$  が 1 未満であることが好ましい（より好ましくは 0.8 以下、特に好ましくは 0.5 以下）。

$\omega/2\pi = 10^{-4} \text{ Hz}$ （ゲルが液体として挙動する振動数）の際に、 $(G''/G')_L = (\tan \delta)_L$  が 1 以上であることが好ましい（より好ましくは 1.5 以上、特に好ましくは 2 以上）。

上記  $(\tan \delta)_s$  と、 $(\tan \delta)_L$  との比  $\{(\tan \delta)_s / (\tan \delta)_L\}$  が 1 未満であることが好ましい（より好ましくは 0.8 以下、特に好ましくは 0.5 以下）。

#### <測定条件>

被覆材の濃度：約 3 質量%

温度：被覆材のゾルーゲル転移温度より約 10℃ 高い温度

測定機器：ストレス制御式レオメータ（機種名：CSL 500、米国キャリーメド社製）

（ハイドロゲル形成性の高分子）

上述したような熱可逆的なゾルーゲル転移を示す（すなわち、ゾルーゲル転移温度を有する）限り、本発明の被覆材に使用可能なハ

イドロゲル形成性の高分子は特に制限されない。生理的温度（0～42℃程度）において好適なゾルーゲル変化を示すことが容易な点からは、例えば、該ハイドロゲル形成性の高分子中の曇点を有する複数のブロックと親水性のブロックの曇点、両ブロックの組成および両ブロックの疎水性度、親水性度、および／又は分子量等をそれぞれ調整することによって達成することが好ましい。

その水溶液がゾルーゲル転移温度を有し、該転移温度より低い温度で可逆的にゾル状態を示す高分子の具体例としては、例えば、ポリプロピレンオキサイドとポリエチレンオキサイドとのブロック共重合体等に代表されるポリアルキレンオキサイドブロック共重合体；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等のエーテル化セルロース；キトサン誘導体（K.R.Holme.et al. *Macromolecules*, 24, 3828（1991））等が知られている。

ポリアルキレンオキサイドブロック共重合体として、ポリプロピレンオキサイドの両端にポリエチレンオキサイドが結合したプルロニック（Pluronic）F-127（商品名、BASF Wyandotte Chemicals Co. 製）ゲルが開発されている。このプルロニックF-127の高濃度水溶液は、約20℃以上でハイドロゲルとなり、これより低い温度で水溶液となることが知られている。しかしながら、この材料の場合は約20質量%以上の高濃度でしかゲル状態にはならず、また約20質量%以上の高濃度でゲル化温度より高い温度に保持しても、さらに水を加えるとゲルが溶解してしまう。また、プルロニックF-127は分子量が比較的小さく、約20質量%以上の高度のゲル状態で非常に高い浸透圧を示すのみならず細胞膜を容易に透過するので、生物体組織に悪影響を及ぼす可能性がある。

一方、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等に代表されるエーテル化セルロースの場合は、通常は、ゾルーゲル転移

温度が高く約 45℃ 以上である (N. Sarkar, J. Appl. Polym. Science, 24, 1073, 1979)。これに対して、生物体組織の保存は殆ど 37℃ 近辺またはそれ以下の温度で実施されるため、上記エーテル化セルロースはゾル状態であり、該エーテル化セルロースを用いる生物体組織の被覆は事実上は困難である。

上記したように、その水溶液中がゾルーゲル転移点を有し、且つ該転移温度より低い温度で可逆的にゾル状態を示す従来の高分子の問題点は、1) ゾルーゲル転移温度より高い温度で一旦ゲル化しても、さらに水を添加するとゲルが溶解してしまうこと、2) ゾルーゲル転移温度が保存温度 (37℃ 近辺またはそれ以下) よりも高く、保存温度ではゾル状態であること、3) ゲル化させるためには、水溶液の高分子濃度を非常に高くする必要があること、等である。

これに対して、本発明者の検討によれば、好ましくは 0℃ より高く 42℃ 以下であるゾルーゲル転移温度を有するハイドロゲル形成性の高分子 (例えば、曇点を有する複数のブロックと親水性のブロックが結合してなり、その水溶液がゾルーゲル転移温度を有し、且つ、ゾルーゲル転移温度より低い温度で可逆的にゾル状態を示す高分子) を用いて生物体組織の被覆材を構成した場合に、上記問題は解決されることが判明している。

(好適なハイドロゲル形成性の高分子)

本発明の被覆材として好適に使用可能な疎水結合を利用したハイドロゲル形成性の高分子は、曇点を有する複数のブロックと親水性のブロックが結合してなることが好ましい。該親水性のブロックは、ゾルーゲル転移温度より低い温度で該ハイドロゲルが水溶性になるために存在することが好ましく、また曇点を有する複数のブロックは、ハイドロゲルがゾルーゲル転移温度より高い温度でゲル状態に変化するために存在することが好ましい。換言すれば、曇点を有

するブロックは該曇点より低い温度では水に溶解し、該曇点より高い温度では水に不溶性に変化するために、曇点より高い温度で、該ブロックはゲルを形成するための疎水結合からなる架橋点としての役割を果たす。すなわち、疎水性結合に由来する曇点が、上記ハイドロゲルのゾルーゲル転移温度に対応する。

ただし、該曇点とゾルーゲル転移温度とは必ずしも一致しなくてもよい。これは、上記した「曇点を有するブロック」の曇点は、一般に、該ブロックと親水性ブロックとの結合によって影響を受けるためである。

本発明に用いるハイドロゲルは、疎水性結合が温度の上昇と共に強くなるのみならず、その変化が温度に対して可逆的であるという性質を利用したものである。1分子内に複数個の架橋点が形成され、安定性に優れたゲルが形成される点からは、ハイドロゲル形成性の高分子が「曇点を有するブロック」を複数個有することが好ましい。

一方、上記ハイドロゲル形成性の高分子中の親水性ブロックは、前述したように、該ハイドロゲル形成性の高分子がゾルーゲル転移温度よりも低い温度で水溶性に変化させる機能を有し、上記転移温度より高い温度で疎水性結合力が増大しすぎて上記ハイドロゲルが凝集沈澱してしまうことを防止しつつ、含水ゲルの状態を形成させる機能を有する。

(曇点を有する複数のブロック)

曇点を有するブロックとしては、水に対する溶解度－温度係数が負を示す高分子のブロックであることが好ましく、より具体的には、ポリプロピレンオキサイド、プロピレンオキサイドと他のアルキレンオキサイドとの共重合体、ポリN－置換アクリルアミド誘導体、ポリN－置換メタアクリルアミド誘導体、N－置換アクリルアミ

ド誘導体とN-置換メタアクリルアミド誘導体との共重合体、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルアルコール部分酢化物からなる群より選ばれる高分子が好ましく使用可能である。上記の高分子（曇点を有するブロック）の曇点が4℃より高く40℃以下であることが、本発明に用いる高分子（曇点を有する複数のブロックと親水性のブロックが結合した化合物）のゾルーゲル転移温度を4℃より高く40℃以下とする点から好ましい。

ここで曇点の測定は、例えば、上記の高分子（曇点を有するブロック）の約1質量%の水溶液を冷却して透明な均一溶液とした後、除々に昇温（昇温速度約1℃/min）して、該溶液がはじめて白濁する点を曇点とすることによって行うことが可能である。

本発明に使用可能なポリN-置換アクリルアミド誘導体、ポリN-置換メタアクリルアミド誘導体の具体的な例を以下に列挙する。

ポリ-N-アクロイルピペリジン；ポリ-N-n-プロピルメタアクリルアミド；ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド；ポリ-N, N-ジエチルアクリルアミド；ポリ-N-イソプロピルメタアクリルアミド；ポリ-N-シクロプロピルアクリルアミド；ポリ-N-アクリロイルピロリジン；ポリ-N, N-エチルメチルアクリルアミド；ポリ-N-シクロプロピルメタアクリルアミド；ポリ-N-エチルアクリルアミド。

上記の高分子は単独重合体（ホモポリマー）であっても、上記重合体を構成する単量体と他の単量体との共重合体であってもよい。このような共重合体を構成する他の単量体としては、親水性単量体、疎水性単量体のいずれも用いることができる。一般的には、親水性単量体と共重合すると生成物の曇点は上昇し、疎水性単量体と共重合すると生成物の曇点は下降する。従って、これらの共重合すべき単量体を選択することによっても、所望の曇点（例えば4℃より



高く 40℃以下の曇点)を有する高分子を得ることができる。

(親水性単量体)

上記親水性単量体としては、N-ビニルピロリドン、ビニルピリジン、アクリルアミド、メタアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、ヒドロキシエチルメタアクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルメタアクリレート、ヒドロキシメチルアクリレート、酸性基を有するアクリル酸、メタアクリル酸およびそれらの塩、ビニルスルホン酸、スチレンスルホン酸等、並びに塩基性基を有するN,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、N,N-ジエチルアミノエチルメタクリレート、N,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドおよびそれらの塩等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

(疎水性単量体)

一方、上記疎水性単量体としては、エチルアクリレート、メチルメタクリレート、グリシジルメタクリレート等のアクリレート誘導体およびメタクリレート誘導体、N-n-ブチルメタアクリルアミド等のN-置換アルキルメタアクリルアミド誘導体、塩化ビニル、アクリロニトリル、スチレン、酢酸ビニル等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

(親水性のブロック)

一方、上記した曇点を有するブロックと結合すべき親水性のブロックとしては、具体的には、メチルセルロース、デキストラン、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、ポリN-ビニルピロリドン、ポリビニルピリジン、ポリアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリN-メチルアクリルアミド、ポリヒドロキシメチルアクリレート、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸およびそれらの塩；ポリN

、N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリN，N-ジエチルアミノエチルメタクリレート、ポリN，N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドおよびそれらの塩等が挙げられる。

曇点を有するブロックと上記の親水性のブロックとを結合する方法は特に制限されないが、例えば、上記いずれかのブロック中に重合性官能基（例えばアクリロイル基）を導入し、他方のブロックを与える単量体を共重合させることによって行うことができる。また、曇点を有するブロックと上記の親水性のブロックとの結合物は、曇点を有するブロックを与える単量体と、親水性のブロックを与える単量体とのブロック共重合によって得ることも可能である。また、曇点を有するブロックと親水性のブロックとの結合は、予め両者に反応活性な官能基（例えば水酸基、アミノ基、カルボキシル基、イソシアネート基等）を導入し、両者を化学反応により結合させることによって行うこともできる。この際、親水性のブロック中には通常、反応活性な官能基を複数導入する。また、曇点を有するポリプロピレンオキサイドと親水性のブロックとの結合は、例えば、アニオン重合またはカチオン重合で、ポリプロピレンオキサイドと「他の親水性ブロック」を構成するモノマー（例えばエチレンオキサイド）とを繰り返し逐次重合させることで、ポリプロピレンオキサイドと「親水性ブロック」（例えばポリエチレンオキサイド）が結合したブロック共重合体を得ることができる。このようなブロック共重合体は、ポリプロピレンオキサイドの末端に重合性基（例えばアクリロイル基）を導入後、親水性のブロックを構成するモノマーを共重合させることによって得ることができる。更には、親水性のブロック中に、ポリプロピレンオキサイド末端の官能基（例えば水酸基）と結合反応し得る官能基を導入し、両者を反応させることによっても、本発明に用いる高分子を得ることができる。また、ポリブ

ロピレングリコールの両端にポリエチレングリコールが結合した、プルロニック F-127（商品名、旭電化工業（株）製）等の材料を連結させることによって、本発明に用いるハイドロゲル形成性の高分子を得ることができる。

この曇点を有するブロックを含む態様における本発明の高分子は、曇点より低い温度においては、分子内に存在する上記「曇点を有するブロック」が親水性のブロックとともに水溶性であるので、完全に水に溶解し、ゾル状態を示す。しかし、この高分子の水溶液の温度を上記曇点より高い温度に加温すると、分子内に存在する「曇点を有するブロック」が疎水性となり、疎水的相互作用によって、別個の分子間で会合する。

一方、親水性のブロックは、この時（曇点より高い温度に加温された際）でも水溶性であるので、本発明の高分子は水中において、曇点を有するブロック間の疎水性会合部を架橋点とした三次元網目構造を持つハイドロゲルを生成する。このハイドロゲルの温度を再び、分子内に存在する「曇点を有するブロック」の曇点より低い温度に冷却すると、該曇点を有するブロックが水溶性となり、疎水性会合による架橋点が解放され、ハイドロゲル構造が消失して、本発明の高分子は、再び完全な水溶液となる。このように、好適な態様における本発明の高分子のゾルーゲル転移は、分子内に存在する曇点を有するブロックの該曇点における可逆的な親水性、疎水性の変化に基づくものであるので、温度変化に対応して、完全な可逆性を有する。

#### （ゲルの溶解性）

上述したように水溶液中でゾルーゲル転移温度を有する高分子を少なくとも含む本発明のハイドロゲル形成性の高分子は、該ゾルーゲル転移温度より高い温度（ $d^{\circ}\text{C}$ ）で実質的に水不溶性を示し、ゾ

ルーゲル転移温度より低い温度（ $e^{\circ}\text{C}$ ）で可逆的に水可溶性を示す。

上記した高い温度（ $d^{\circ}\text{C}$ ）は、ゾルーゲル転移温度より  $1^{\circ}\text{C}$  以上高い温度であることが好ましく、 $2^{\circ}\text{C}$  以上（特に  $5^{\circ}\text{C}$  以上）高い温度であることが更に好ましい。また、上記「実質的に水不溶性」とは、上記温度（ $d^{\circ}\text{C}$ ）において、水  $100\text{ mL}$  に溶解する上記高分子の量が、 $5.0\text{ g}$  以下（更には  $0.5\text{ g}$  以下、特に  $0.1\text{ g}$  以下）であることが好ましい。

一方、上記した低い温度（ $e^{\circ}\text{C}$ ）は、ゾルーゲル転移温度より（絶対値で） $1^{\circ}\text{C}$  以上低い温度であることが好ましく、 $2^{\circ}\text{C}$  以上（特に  $5^{\circ}\text{C}$  以上）低い温度であることが更に好ましい。また、上記「水可溶性」とは、上記温度（ $e^{\circ}\text{C}$ ）において、水  $100\text{ mL}$  に溶解する上記高分子の量が、 $0.5\text{ g}$  以上（更には  $1.0\text{ g}$  以上）であることが好ましい。更に「可逆的に水可溶性を示す」とは、上記ハイドロゲル形成性の高分子の水溶液が、一旦（ゾルーゲル転移温度より高い温度において）ゲル化された後においても、ゾルーゲル転移温度より低い温度においては、上記した水可溶性を示すことをいう。

上記高分子は、その  $10\%$  水溶液が  $5^{\circ}\text{C}$  で、 $10\sim 3,000$  センチポイズ（更には  $50\sim 1,000$  センチポイズ）の粘度を示すことが好ましい。このような粘度は、例えば以下のような測定条件下で測定することが好ましい。

粘度計：ストレス制御式レオメータ（機種名：CSL 500、米国 キャリーメド社製）

ローター直径： $60\text{ mm}$

ローター形状：平行平板

測定周波数： $1\text{ Hz}$ （ヘルツ）

本発明のハイドロゲル形成性の高分子の水溶液は、上記ゾルーゲル転移温度より高い温度でゲル化させた後、多量の水中に浸漬しても、該ゲルは実質的に溶解しない。上記被覆材料の上記特性は、例えば、以下のようにして確認することが可能である。

すなわち、本発明のハイドロゲル形成性の高分子 0.15 g を、上記ゾルーゲル転移温度より低い温度（例えば氷冷下）で、蒸留水 1.35 g に溶解して 10 W % の水溶液を作製し、該水溶液を径が 35 mm のプラスチックシャーレ中に注入し、37℃に加温することによって、厚さ約 1.5 mm のゲルを該シャーレ中に形成させた後、該ゲルを含むシャーレ全体の重量（f グラム）を測定する。次いで、該ゲルを含むシャーレ全体を 250 ml 中の水の中に 37℃で 10 時間静置した後、該ゲルを含むシャーレ全体の重量（g グラム）を測定して、ゲル表面からの該ゲルの溶解の有無を評価する。この際、本発明のハイドロゲル形成性の高分子においては、上記ゲルの重量減少率、すなわち  $(f - g) / f$  が、5.0 % 以下であることが好ましく、更には 1.0 % 以下（特に 0.1 % 以下）であることが好ましい。

本発明のハイドロゲル形成性の高分子の水溶液は、上記ゾルーゲル転移温度より高い温度でゲル化させた後、多量（体積比で、ゲルの 0.1 ～ 100 倍程度）の水中に浸漬しても、長期間に亘って該ゲルは溶解することがない。このような本発明に用いる高分子の性質は、例えば、該高分子内に曇点を有するブロックが 2 個以上（複数個）存在することによって達成される。

これに対して、ポリプロピレンオキサイドの両端にポリエチレンオキサイドが結合してなる前述のプルロニック F-127 を用いて同様のゲルを作成した場合には、数時間の静置で該ゲルは完全に水に溶解することを、本発明者らは見出している。

非ゲル化時の細胞毒性をできる限り低いレベルに抑える点からは、水に対する濃度、すなわち  $\{ (\text{高分子}) / (\text{高分子} + \text{水}) \} \times 100$  (%) で、20%以下（更には15%以下、特に10%以下）の濃度でゲル化が可能なハイドロゲル形成性の高分子を用いることが好ましい。

#### （他の成分）

本発明の被覆材は、上記したゾルーゲル転移温度を有する高分子を少なくとも含むものであるが、必要に応じて他の成分を含んでもよい。このような態様における「他の成分」としては、例えば、抗生剤、コラーゲン等のECM、前述した局所性化学仲介物質、インスリン細胞、成長因子等のホルモン類等が挙げられる。

#### （生物体組織）

本発明において「生物体組織」とは、動物（特にヒト）、植物、微生物、ウイルス等の生物体の組織をいい、組織そのもの、組織の断片、さらには組織から分離した細胞ないしその集合体を包含する意味で用いる。本発明に使用可能な「生物体組織」は、保存・維持が可能な程度の生細胞数を有していれば足り、単細胞状態でも多細胞状態でもよい。また、該組織が由来するドナー自体は、特に制限されない。例えば、該ドナーは、生体でもよく、また所定の状態（例えば、極低温）で保存された生物の死体であってもよい。前述したように、例えば極低温で保存された生物死体から取り出された細胞組織は、急速融解する際に、その一部ないし大部分（例えば、該組織片の中心部）の細胞が破壊されて生存細胞数が著しく減少する可能性があるが、このような場合であっても、本発明の被覆材を用いて保存・維持が可能な程度の生細胞数を有している限り、本発明において使用可能である。

以下に述べる生細胞率、細胞生存率の測定においては、例えば食

道、胃、小腸、大腸、膵臓、肝臓、皮フ、血管、骨等（特に、後述するヒト大腸癌組織）のヒト由来の組織が好適に使用可能である。

（生物体組織の例示）

本発明の被覆材は、例えば、従来より種々の「保存液」を用いて保存および／又は運搬していた生物体組織（ないし細胞）に対しても好適に使用可能である。このような生物体組織（ないし細胞）の例としては、上記したもの（例えば、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、肝臓、皮フ、血管、骨等）以外にも、以下のものを例示することができる。

（１）移植用の組織・器官：角膜、皮膚、骨

（２）血液成分：赤血球、白血球、血小板

（３）免疫システム関連細胞：Ｔ細胞（例えば、被験者から採取したＴ細胞を保存して、必要に応じて、該被験者に戻す）、樹状細胞

（４）その他：胎児細胞、ＥＳ細胞（いわゆる万能細胞）、受精卵（例えば、体内／体外受精用）

（被覆直前の生細胞率）

保存・維持が可能である限り、本発明に使用可能な「生物体組織」のサイズ、形態、構造等は特に制限されないが、取扱の容易性の点からは、被覆材で被覆する直前の状態で、後述するような酵素活性を用いる方法により測定された  $OD(450) / mg \text{ protein}$  の値（生物体組織中の生細胞率に対応； $T=0$ ）で、 $1.0$  以上程度、更には  $2.0$  以上程度であることが好ましい。

（被覆７日後の生細胞率）

本発明においては、被覆材による保存・維持の容易性の点からは、上記被覆材で被覆してから７日後の状態で、上記した生細胞率に対応する  $A_T = OD(450) / mg \text{ protein}$  の値（ $T=7$ ）で、 $1.0$  以上程度、更には  $1.5$  以上程度であることが好

ましい。

(生物体組織の細胞生存率)

本発明において、被覆直前の生物体組織片中の細胞の生存率 ( $A_0$ ) と、被覆 2 日後の該組織片中の細胞の生存率 ( $A_2$ ) との比 ( $A_2/A_0$ ) は、20%以上、更には30%以上 (特に50%以上) であることが好ましい。

また、本発明において、被覆直前の生物体組織片中の細胞の生存率 ( $A_0$ ) と、被覆 7 日後の該組織片中の細胞の生存率 ( $A_7$ ) の比 ( $A_7/A_0$ ) は、5%以上、更には10%以上 (特に20%以上) であることが好ましい。

上記した各生存率 ( $A_T$ ) は、例えば、以下の酵素活性を利用する方法により測定可能である。

<細胞生存率の測定方法>

24-ウェルプレート (材料: プラスチック製、ウェル1個の大きさは縦15mm、横15mm、深さ20mm程度; 市販品では、例えばBecton-Dickinson社製の商品名: Multiwell) の各ウェル中で、測定対象たる生物体組織 (体積:  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  mm 程度) を本発明の被覆材中 (ゾル状態で200  $\mu$ l 程度) に抱埋し、保存した生物体組織の温度を、該被覆材のゾルーゲル転移温度より低い温度 (例えば、ゾルーゲル転移温度より10℃低い温度) に下げることによって該被覆材を溶解した後、各ウェル中にコハク酸脱水素酵素活性測定用試薬たるWST-8試薬 (同仁化学 (株) 製) 50  $\mu$ l を添加する。この24-ウェルプレートを、ゾルーゲル転移温度より低い温度 (例えばゾルーゲル転移温度より10℃低い温度、例えば10℃) で10時間反応させた後、約4℃に1時間保存し完全に均一な水溶液の状態にする。

該水溶液を96-ウェルプレートに200  $\mu$ l ずつ分注し、マイ



クロプレート用比色計を用いて450nm（参照波長620nm）で吸光度（OD（450））を測定する。このOD（450）と、生物体組織中の生細胞数とは比例関係にあることが確かめられている（例えば、文献Furukawa, T. et al, "High in vitro-in vitro correlation of drug response using spongegel-supported three-dimensional histoculture and MTT end point", Int.J.Cancer 51 : 489、1992を参照）。

一方、生物体組織の全細胞数の目安としては、該組織の総タンパク量を用いることができる。組織中の総タンパク量は、例えばBCA（Bicinchoninic acid）Protein Assay Kit（同仁化学（株）製）を用いて測定することができる。

組織中の総タンパク量の測定は、生物体組織（体積：0.5×0.5×0.5mm程度）をWST-8試薬と反応させた後、4℃で多架式遠心分離機（例えば、トミー精工社製、商品名：Multipurpose Refrigerated Centrifuge LX-120；回転数4,000rpm）によって遠心し、組織と反応液を分離し、反応液を除去した後、組織を含むウェル中にBCA試薬200μlを添加し、37℃で30分間反応させた後、マイクロプレート用比色計（例えば、大日本製薬社製、商品名：Labosystems Multiscan MS）を用いて波長570nmで吸光度（OD（570））を測定する。

組織の重量とOD（570）は比例関係にあることが確かめられている（例えば、松岡博光、“熱可逆性ハイドロゲル（TGP）を培養用基材に用いた三次元培養による抗癌剤感受性試験”、聖マリアンナ医科大学雑誌、27：133～140、1999を参照）。

上記で測定したOD（450）と、OD（570）とに基づき、一定期間（T日）保存後の組織中の細胞の生存率 $A_T$ は以下の式で

表される。

$$A_T = OD(450) / OD(570) \quad (\text{例えば、} T = 0、2、7 \text{ 以上})$$

(溶出抑制作用)

本発明の被覆材（前記高分子に基づくハイドロゲル）は、被被覆体たる生物体組織中の物質（例えば生理活性物質）の該組織外への溶出を抑制する三次元網目構造を有する。また、該被覆材が疎水性部分を含む態様において、この疎水性部分は、生物体組織中の脂溶性物質（例えば脂溶性生理活性物質）の該組織外への溶出を抑制する作用を有する。

(生物体組織の保存・維持法)

生物体組織、好ましくは動物（特にヒト）の生体組織から手術等によって摘出した組織、或いは器官の断片を活性を維持した良好な状態で保存するためには、外部からの栄養分の補給、および該組織、或いは器官断片の中に蓄積される老廃物の除去を効率よく行うことが好ましい。

生物体組織の保存・維持が可能である限り、本発明の被覆法で被覆可能な生物体組織の大きさは特に制限されないが、上記した栄養補給・老廃物除去効率の点からは、本発明の被覆材による被覆に先行して、上述した該組織、或いは器官の断片の大きさ（例えば該断片と同一体積の立方体とした時の一辺の長さ）が2 mm以下、好ましくは1 mm以下、より好ましくは0.5 mm以下となるように細切することが好ましい。

別に、ハイドロゲル形成性高分子（本発明の被覆材）を組織培養液（例えば、Life Technologies 社製、商品名：RPMI-1640）に好ましくは1～20質量%、更に好ましくは3～15質量%（特に、5～10質量%）の濃度範囲内で該高分子のゾルーゲル転

移温度より低い温度の温度で溶解する。

本発明において、上記で得た生物体組織（例えば、断片）を本発明の被覆材に被覆ないし包埋して保存する方法は非常に簡便である。例えば、ゾルーゲル転移温度より低い温度で該被覆材をゾル（溶解）状態とし、結果として得られた該被覆材溶液中に組織断片を浸漬する方法、或いは該組織断片上に該ハイドロゲルの溶液をふりかけることにより被覆する方法等が採用可能である。このように被覆材を浸漬、塗布ないし包埋した組織断片の周囲に配置された被覆材を、ハイドロゲル形成性高分子のゾルーゲル転移温度より高い温度でゲル化させ、組織断片を本発明の被覆材で被覆することが可能である。

ここで、生物体組織を保存する温度は、該生物体細胞の適温以下であることが好ましい。すなわち、定温動物細胞を用いる場合には、保存温度は、通常、その体温（ヒトでは約37℃）以下であることが好ましい。代謝速度抑制の点からは、該保存温度は、更には室温（約25℃）以下、特に20℃以下であることが好ましい。また、ヒト組織を用いる場合には、ハイドロゲル形成性高分子のゾルーゲル転移温度は37℃以下（更には25℃以下）であることが好ましい。

（保存した生物体組織の回収）

一方、本発明の被覆材により保存した生物体組織（例えば、組織断片）を該被覆材から回収する方法（換言すれば、保存した生物体組織から被覆材を除去する方法）も、非常に簡便である。該被覆材のゾルーゲル転移温度より低い温度で該被覆材を融解（ゾル化）する方法、或いは該被覆材によって被覆保存した生物体組織をゾルーゲル転移温度より低い温度に冷却した培養液、或いは保存液中に浸漬して、該被覆材を溶解する方法等が実施可能である。

### （包埋／支持）

本発明の被覆材を用いて、生物体組織を包埋／支持、保存培養し、更に回収する方法を、図 1（a）、図 1（b）および図 1（c）の模式斜視図に示す。この図 1（a）、図 1（b）および図 1（c）の例では、例えば、ゾルーゲル転移温度が約 20℃のハイドロゲル形成性高分子を用い、10℃の水溶液状態で生物体組織を入れ（図 1（a））、次いで 37℃でゲル化させて該組織を包埋し（図 1（b））、更に図 1（c）に示すように再び 10℃で水溶液状態として該組織を回収する。

### （保存／運搬）

本発明の被覆材は、生物体組織の保存および／又は運搬にも、好適に使用可能である。例えば、後述する実施例に示すように本発明の被覆材に基づくゲル中に生物体組織を包埋ないし支持して実際の使用時または使用場所まで保存／運搬することができる。このような場合、従来は種々の「保存液」に浮遊ないし懸濁させて生物体組織を保存／運搬していたが、このような「保存液」を使用した場合には、生物体組織と容器壁等との接触ないしは生物体組織同士の接触により、保存／運搬時に生物体組織が損傷を受けることが多くあった。更には、保存／運搬すべき生物体組織が赤血球、白血球、血小板等の血液成分である場合には、これらの成分は接触により機械的損傷を受けたり、凝集してしまう場合があった。

これに対して、本発明の被覆材に基づくゲル中に生物体組織を包埋ないし支持させた場合には、ゲル状態であることに基いて生物体組織・器官の相互接触、容器への接触等が効果的に防止され、該組織・器官の機械的な損傷が防止できる。同様の理由から、赤血球、白血球、血小板等の血液成分の凝集も防止できる。更には、本発明の被覆材に基づくゲル中に生物体組織を包埋ないし支持させるこ

とにより、保存／運搬時に喻え容器が破損しても、生物体組織・器官の周辺環境への飛散が防止できる。このような飛散防止は、例えば、該組織・器官が周辺環境の汚染を生ずる可能性がある（例えば、遺伝子工学により作成した細胞、あるいは感染力の強い細菌、ウイルス等の）場合に、特に効果的である。

免疫関係の細胞に本発明の被覆材を適用した場合には、例えば、免疫が低下している被験者から採取したT細胞をインターロイキン等の活性化物質を用いて再活性化した後、該被験者に戻して免疫増強を図ることが可能となる。このような場合には、T細胞の採取、活性化、戻しがそれぞれ異なる場所で行われる場合も多いため、その保存／運搬に本発明の被覆材が特に好適に使用可能である。本発明の被覆材をES細胞（いわゆる万能細胞）に適用した場合にも、該細胞同士および／又は該細胞と容器との接触を有効に防止でき、該細胞の活性維持が容易である。

### 実施例

以下に実施例を示し、本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲は特許請求の範囲により限定されるものであり、以下の実施例によって限定されるものではない。

#### 製造例 1

ポリプロピレンオキサイドーポリエチレンオキサイド共重合体（プロピレンオキサイド／エチレンオキサイド平均重合度約60／180、旭電化工業（株）製：プルロニックF-127）10gを乾燥クロロホルム30mlに溶解し、五酸化リン共存下、ヘキサメチレンジイソシアネート0.13gを加え、沸点還流下に6時間反応させた。溶媒を減圧留去後、残さを蒸留水に溶解し、分画分子量3万の限外濾過膜（アミコンPM<sup>-3</sup>0）を用いて限外濾過を行い、高

分子量重合体と低分子量重合体を分画した。得られた水溶液を凍結して、F-127高重合体およびF-127低重合体を得た。

上記により得たF-127高重合体(TGP-1)を、氷冷下、8質量%の濃度で蒸留水に溶解した。この水溶液をゆるやかに加温していくと、21℃から徐々に粘度が上昇し、約27℃で固化して、ハイドロゲルとなった。このハイドロゲルを冷却すると、21℃で水溶液に戻った。この変化は、可逆的に繰り返し観測された。一方、上記F-127低重合体を、氷点下8質量%の濃度で蒸留水に溶解したものは、60℃以上に加熱しても全くゲル化しなかった。

## 製造例 2

トリメチロールプロパン1モルに対し、エチレンオキサイド160モルをカチオン重合により付加して、平均分子量約7000のポリエチレンオキサイドトリオールを得た。

上記により得たポリエチレンオキサイドトリオール100gを蒸留水1000mlに溶解した後、室温で過マンガン酸カリウム12gを徐々に加えて、そのまま約1時間、酸化反応させた。固形物を濾過により除いた後、生成物をクロホルムで抽出し、溶媒(クロホルム)を減圧留去してポリエチレンオキサイドトリカルボキシル体90gを得た。

上記により得たポリエチレンオキサイドトリカルボキシル体10gと、ポリプロピレンオキサイドジアミノ体(プロピレンオキサイド平均重合度約65、米国ジェファーソンケミカル社製、商品名:ジェファーミンD-4000、曇点:約9℃)10gとを四塩化炭素1000mlに溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド1.2gを加えた後、沸点還流下に6時間反応させた。反応液を冷却し、固形物を濾過により除いた後、溶媒(四塩化炭素)を減圧留去し、残さを真空乾燥して、複数のポリプロピレンオキサイドとポリエチ

レンオキサイドとが結合した被覆用高分子（TGP-2）を得た。これを氷冷下、5質量%の濃度で蒸留水に溶解し、そのゾルーゲル転移温度を測定したところ、約16℃であった。

### 製造例 3

N-イソプロピルアクリルアミド（イーストマンコダック社製）96g、N-アクリロキシスクシンイミド（国産化学（株）製）17g、およびn-ブチルメタクリレート（関東化学（株）製）7gをクロロホルム4000mlに溶解し、窒素置換後、N，N'-アゾビスイソブチロニトリル1.5gを加え、60℃で6時間重合させた。反応液を濃縮した後、ジエチルエーテルに再沈（再沈殿）した。濾過により固形物を回収した後、真空乾燥して、78gのポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-N-アクリロキシスクシンイミド-コ-n-ブチルメタクリレート）を得た。

上記により得たポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-N-アクリロキシスクシンイミド-コ-n-ブチルメタクリレート）に、過剰のイソプロピルアミンを加えてポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-n-ブチルメタクリレート）を得た。このポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-n-ブチルメタクリレート）の水溶液の曇点は19℃であった。

前記のポリ（N-イソプロピルアクリルアミド-コ-N-アクリロキシスクシンイミド-コ-n-ブチルメタクリレート）10g、および両末端アミノ化ポリエチレンオキサイド（分子量6,000、川研ファインケミカル（株）製）5gをクロロホルム1000mlに溶解し、50℃で3時間反応させた。室温まで冷却した後、イソプロピルアミン1gを加え、1時間放置した後、反応液を濃縮し、残渣をジエチルエーテル中に沈澱させた。濾過により固形物を回収した後、真空乾燥して、複数のポリ（N-イソプロピルアクリル

アミドコーンブチルメタクリレート) とポリエチレンオキサイドとが結合した被覆用高分子 (TGP-3) を得た。

このようにして得た TGP-3 を氷冷下、5 質量% の濃度で蒸留水に溶解し、そのゾルーゲル転移温度を測定したところ、約 21℃ であった。

#### 製造例 4

(滅菌方法)

上記した高分子 (TGP-1) の 2.0 g を、EOG (エチレンオキサイドガス) 滅菌バッグ (ホギメディカル社製、商品名: ハイブリッド滅菌バッグ) に入れ、EOG 滅菌装置 (イーザーパック、井内盛栄堂製) で EOG をバッグに充填し、室温にて一昼夜放置した。さらに 40℃ で半日放置した後、EOG をバッグから抜き、エアレーションを行った。バッグを真空乾燥器 (40℃) に入れ、時々エアレーションしながら半日放置することにより滅菌した。

この滅菌操作により高分子のゾルーゲル転移温度が変化しないことを、別途確認した。

#### 製造例 5

ブチルメタクレリレートの使用量を以下のように変更した以外は製造例 3 と同様にして、ゾルーゲル転移温度がそれぞれ 10℃、20℃ および 35℃ のハイドロゲル形成性の高分子を得た。

<ゾルーゲル転移温度> <ブチルメタクレリレートの使用量>

10℃	14 g
20℃	8 g
35℃	0 g

これらのハイドロゲル形成性の高分子の温度変化に基づく粘度変化を測定したところ、図 2 のグラフに示す結果が得られた。

#### 製造例 6



製造例 3 の被覆用高分子 (TGP-3) を 10 質量% の濃度で蒸留水に溶解し、37℃における  $\eta$  を測定したところ、 $5.8 \times 10^5$  Pa · sec であった。一方、寒天を 2 質量% の濃度で蒸留水に 90℃で溶解して、10℃で 1 時間ゲル化させた後、37℃における  $\eta$  を測定したところ、その  $\eta$  は機器の測定限界 ( $1 \times 10^7$  Pa · sec) を越えていた。

#### 実施例 1

製造例 1 で作製したポリマー (TGP-1) を製造例 4 の方法によって滅菌した後、該ポリマーの最終濃度が約 8% になるように 20% の胎児牛血清 (FCS; Dainippon Pharmaceutical 社製、商品名: Fetal Calf Serum) および抗生剤 (Life Technologies 社製、商品名: penicillin; 最終濃度 10,000 U/ml) を含有する RPMI-1640 (Life Technologies 社製) 中に、4℃で 24 時間、攪拌下に溶解した。この操作は無菌的に実施した。

3 人の大腸癌患者から手術により摘出された大腸癌組織、およびその周辺の正常大腸粘膜組織を、組織細切器 (The Mickle Laboratory Engineering Co.Ltd. 製) で約 0.5 mm の厚さに細切した。8% の TGP-1 含有培養液を、10℃に冷却しゾル状態にして、そのゾル (約 200  $\mu$ l) 中に該癌組織および正常組織を分散させた。上記により得た組織分散液を、24-ウェルプレート (Becton-Dickinson 社製、商品名: Multiwell) の各ウェル (大きさ: 15 × 15 mm) 中に組織 (組織片 1 個の大きさ: 0.5 × 0.5 mm 程度) が 1 ~ 2 個含有されるように、約 600  $\mu$ l / ウェルの組織分散 TGP-1 溶液を分注した。

該 24-ウェルプレートを 37℃、5% CO<sub>2</sub> 濃度のインキュベーター (ダバイエスベック社製、商品名: CO<sub>2</sub> Incubator) 中で、それぞれ 1、2、4、7、および 14 日間保存した。各期間保存

後、上述した細胞生存率の測定法によって細胞生存率を測定し、保存前の生存率 ( $A_0$ ) と各期間 (T 日) 保存後の生存率 ( $A_T$ ) との比 ( $A_T / A_0 \times 100\%$ ) を測定した。得られた結果を、表 1 および 2 に示す。

表 1

大腸癌組織を T G P - 1 ゲル内に抱埋して保存した時の組織中の細胞生存率の比 ( $A_T / A_0 \times 100\%$ ) と保存日数との関係

症例／保存日数	0	1	2	4	7	14
1	100	106	109	114	100	72
2	100	111	117	119	115	78
3	100	98	110	121	106	64

表 2

正常粘膜組織を T G P - 1 ゲル内に抱埋して保存した時の組織中の細胞生存率の比 ( $A_T / A_0 \times 100\%$ ) と保存日数との関係

症例／保存日数	0	1	2	4	7	14
1	100	113	110	82	52	44
2	100	103	96	66	39	42
3	100	116	119	87	52	51

### 比較例 1

実施例 1 で用いた大腸癌組織および正常大腸粘膜組織を、20% の胎児牛血清、(Dainippon Pharmaceutical 社製、商品名：Fetal Calf Serum) および抗生剤 (Life Technologies 社製、商品名：penicillin) を含有する R P M I - 1 6 4 0 (Life Technologies 社製) 中に分散させた。得られた分散液を、24-ウェルの各ウェル

中に組織が 1 ～ 2 個含有するように約  $600 \mu\text{l}$  / ウェルを注入し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  濃度のインキュベーター中で 1、2、4、7、および 14 日間保存した。各期間保存後に、実施例と同様の方法で各組織中の細胞の生存率の比 ( $A_T / A_0 \times 100\%$ ) を測定した。得られた結果を表 3 および 4 に示す。

表 3

大腸癌組織を培地中に保存した時の細胞生存率の比  
( $A_T / A_0 \times 100\%$ ) と保存日数との関係

症例／保存日数	0	1	2	4	7	14
1	100	49	47	—	—	—
2	100	54	—	—	—	—
3	100	55	—	—	—	—

—：生存率が低く測定不能

表 4

正常粘膜組織を培地中に保存した時の細胞生存率の比  
( $A_T / A_0 \times 100\%$ ) と保存日数との関係

症例／保存日数	0	1	2	4	7	14
1	100	30	—	—	—	—
2	100	—	—	—	—	—
3	100	—	—	—	—	—

—：生存率が低く測定不能

上記した実施例 1 に示したように、本発明の被覆材 (TGP) で被覆保存した癌組織、および正常組織中の細胞生存率の比 (2 日間保存) は共に  $100\%$  以上であった。これに対して、比較例 1 に示したように、従来の被覆法である保存液中に浸漬した場合には、細胞生存率の比 (2 日間保存) は殆ど 0 であった。

T G P 中で 2 日間保存した際の細胞生存率が保存前の生存率よりも高くなる理由としては、本発明者の知見によれば、組織を生体から取り出し細切するという操作が細胞に損傷を与えるが、T G P 中で保存するとその損傷が回復し、細胞生存率が改善されるものと推定される。また、7 日間保存した試料では、T G P 被覆保存の場合は生存率の比は癌組織の場合で約 1 0 0 %、正常組織の場合で 4 0 ~ 5 0 % であるのに対して、従来の被覆法では細胞の生存は認められなかった。更に、上記した実験事実は、癌組織は正常組織よりも保存性が良好であることを示している。

上記の結果を、図 3（大腸癌の原発巣の 1 0 0 倍像）、図 4（大腸癌の培養 1 4 日後の 1 0 0 倍像）、図 5 および 6（大腸癌組織の 7 日培養の 1 0 0 倍および 2 0 0 倍像）、および図 7 および 8（大腸正常組織の 7 日培養の 1 0 0 倍および 2 0 0 倍像）の光学顕微鏡写真に、それぞれ示す。これらの写真を見れば、本発明の被覆材を用いることにより、培養前の組織が、培養後も良好に保持されていることが容易に理解できよう。

#### 産業上の利用可能性

上述したように本発明によれば、生物体組織を細胞活性を維持しつつ、長期間保存し、および／又は運搬することが可能な生物体組織用被覆材、および該被覆材を用いる生物体組織の被覆体、および生物体組織の被覆法が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含む生物体組織用被覆材であって；

該被覆材が低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾル-ゲル転移を示し、且つ、前記被覆材による被覆直前の生物体組織中の細胞の生存率 ( $A_0$ ) と、該被覆 2 日後の該組織中の細胞の生存率 ( $A_2$ ) との比 ( $A_2/A_0$ ) として 20% 以上を与えることを特徴とする生物体組織用被覆材。

2. ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含む生物体組織用被覆材であって；

該被覆材が低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾル-ゲル転移を示し、且つ、該被覆材による被覆直前の生物体組織片中の細胞の生存率 ( $A_0$ ) と、該被覆 7 日後の該組織片中の細胞の生存率 ( $A_7$ ) との比 ( $A_7/A_0$ ) として 5% 以上を与えることを特徴とする生物体組織用被覆材。

3. 前記高分子に基づくハイドロゲルが、生物体組織中の物質の該組織外への溶出を抑制する三次元網目構造を有する請求項 1 または 2 に記載の生物体組織用被覆材。

4. 前記高分子に基づくハイドロゲルが、生物体組織中の脂溶性物質の該組織外への溶出を抑制する疎水性部分を少なくとも一部に含む請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の生物体組織用被覆材。

5. 前記高分子に基づくハイドロゲルが、被被覆物たる生物体組織の形態的変形に追従して該組織との密着性を維持する部分を少なくとも一部に含む請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の生物体組織用被覆材。

6. 前記高分子に基づくハイドロゲルが、曇点を有する、複数の

ブロックと親水性のブロックとが結合してなる部分を少なくとも一部に含む請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の生物体組織用被覆材。

7. その水溶液がゾルーゲル転移温度より低い温度で可逆的に液体状態（ゾル状態）を示し、且つそのゾルーゲル転移温度より高い温度で一旦ゲル化した状態が、該温度で新たに加えた水に対して実質的に不溶である請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の生物体組織用被覆材。

8. 前記ゾルーゲル転移温度が 0℃より高く 42℃以下である請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の生物体組織用被覆材。

9. ハイドロゲル形成性の高分子を含み、且つ低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示す被覆材を含む溶液を、該ゾルーゲル転移温度より低い温度でゾル状態とし；

生物体組織に、該ゾル状態の被覆材を塗布し、

該被覆材をゾルーゲル転移温度より高い温度でゲル化させて前記生物体組織を被覆することを特徴とする生物体組織の被覆方法。

10. 更に、前記生物体組織を被覆している被覆材をゾルーゲル転移温度より低い温度で再びゾル状態として、生物体組織から除去する請求項 9 記載の生物体組織の被覆方法。

11. 生物体組織と、

該生物体組織の周囲に配置された被覆材とを少なくとも含む生物体組織の被覆体であって；

該被覆材が、ハイドロゲル形成性の高分子を含み、低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示し；且つ、該被覆材による被覆直前の生物体組織中の細胞の生存率（ $A_0$ ）と、該被覆 2 日後の該組織中の細胞の生存率（ $A_2$ ）との比（ $A_2/A_0$ ）が 20%以上であることを特徴とする生物体組織の被覆体。

12. 生物体組織と、

該生物体組織の周囲に配置された被覆材とを少なくとも含む生物体組織の被覆体であって；

該被覆材が、ハイドロゲル形成性の高分子を含み、低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示し；且つ、該被覆材による被覆直前の生物体組織中の細胞の生存率（ $A_0$ ）と、該被覆 7 日後の該組織片中の細胞の生存率（ $A_7$ ）との比（ $A_7/A_0$ ）が 5 % 以上であることを特徴とする生物体組織の被覆体。

1 3．前記生物体組織が動物由来の組織である請求項 1 1 または 1 2 に記載の生物体組織被覆体。

1 4．前記生物体組織が哺乳類由来の組織である請求項 1 3 に記載の生物体組織被覆体。

1 5．前記生物体組織がヒト由来の組織である請求項 1 4 に記載の生物体組織被覆体。

1 6．前記ヒト由来の組織が、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、肝臓、皮フ、血管、骨、血液成分から選ばれた少なくとも 1 つの組織由来である請求項 1 5 に記載の生物体組織被覆体。

1 7．ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含む生物体組織用被覆材であって；

該被覆材が低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾルーゲル転移を示し、且つ、

そのゾルーゲル転移温度より約 1 0 °C 高い温度において、振動数が  $\omega/2\pi = 1 \text{ Hz}$  の歪みに対して固体として挙動し、 $\omega/2\pi = 1 0^{-4} \text{ Hz}$  の歪みに対して液体として挙動することを特徴とする生物体組織用被覆材。

1 8．ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含む生物体組織用被覆材であって；

該被覆材が低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾ

ル-ゲル転移を示し、且つ、

そのゾル-ゲル転移温度より約  $10^{\circ}\text{C}$  高い温度において、振動数が  $\omega / 2\pi = 1\text{ Hz}$  の歪みに対する動的弾性率／損失弾性率  $(G'' / G')$   $_s = (\tan \delta)_s$  と、 $\omega / 2\pi = 10^{-4}\text{ Hz}$  の歪みに対する  $(G'' / G')$   $_L = (\tan \delta)_L$  との比  $\{ (\tan \delta)_s / (\tan \delta)_L \}$  が 1 未満であることを特徴とする生物体組織用被覆材。

19. ハイドロゲル形成性の高分子を少なくとも含む生物体組織用被覆材であって；

該被覆材が低温でゾル状態、高温でゲル状態となる熱可逆的なゾル-ゲル転移を示し、且つ、

そのゾル-ゲル転移温度より約  $10^{\circ}\text{C}$  高い温度において、定常流動粘度  $\eta$  が  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^6 \text{ Pa} \cdot \text{sec}$  であることを特徴とする生物体組織用被覆材。



Fig. 1(a)

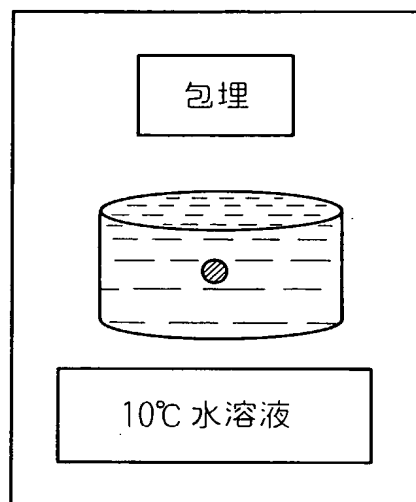


Fig. 1(b)

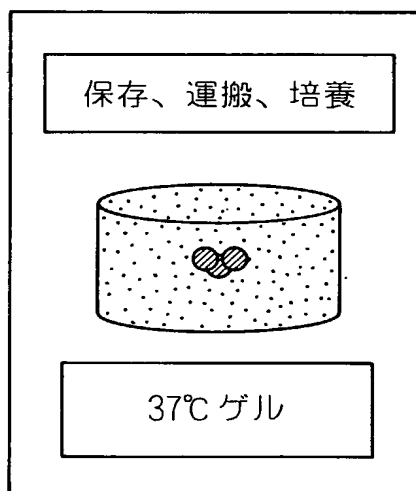


Fig. 1(c)

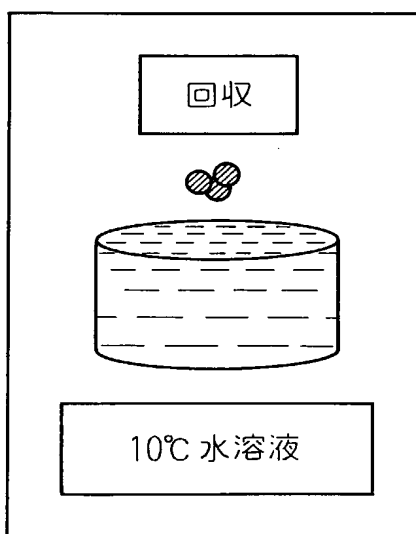


Fig.2

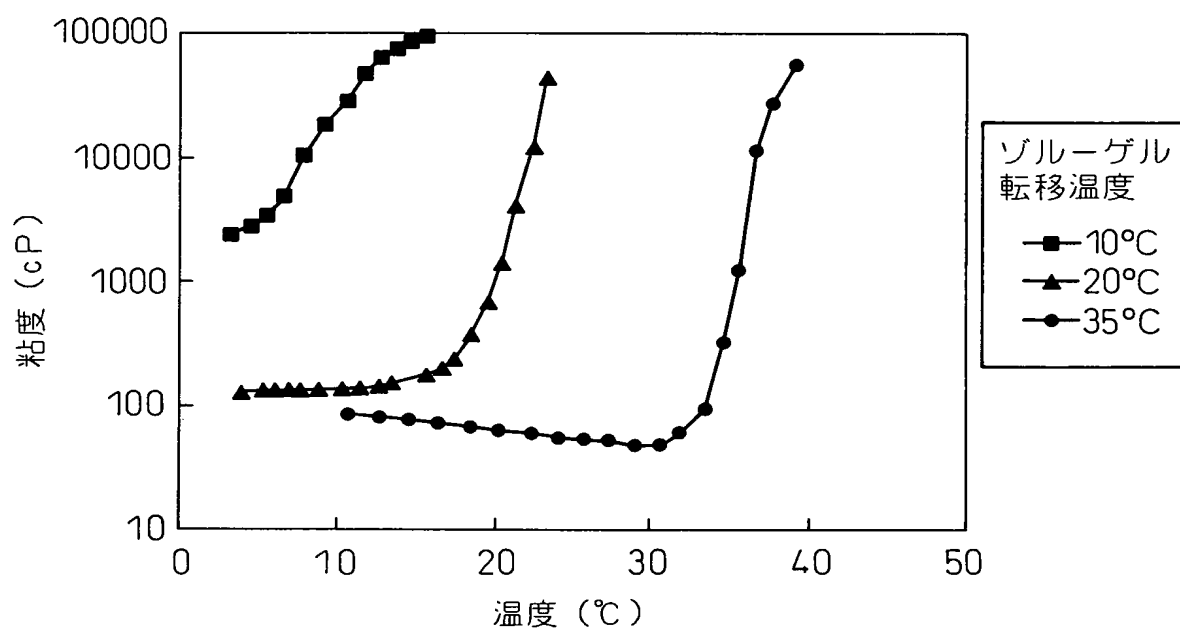
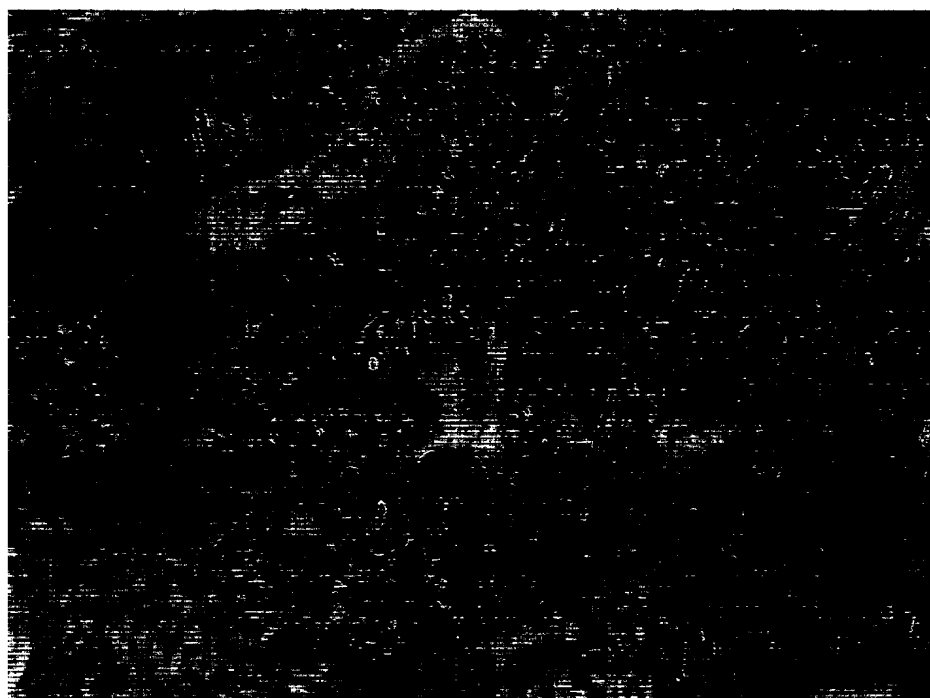


Fig.3



大腸癌原発巣 (×100)

Fig.4



培養14日後 (×100)

4/6

差替え用紙(規則26)

Fig.5



100×

Fig.6



200×

5/6

差替え用紙(規則26)

Fig.7

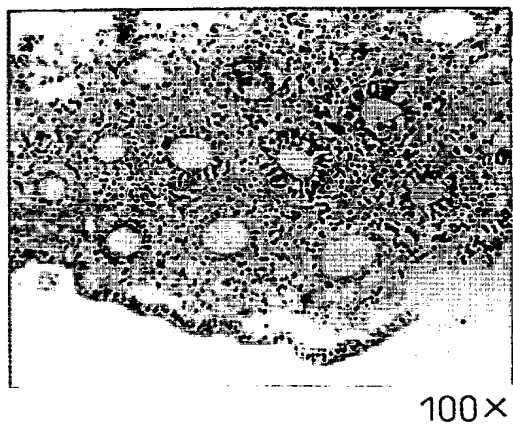
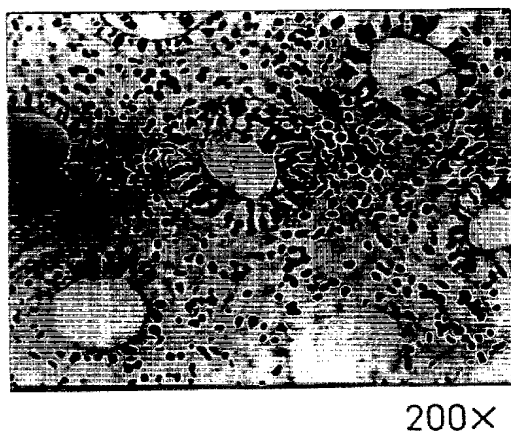


Fig.8



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02241

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A01N1/02, C12N5/00, G01N33/48, G01N1/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A01N1/02, C12N5/00, G01N33/48, G01N1/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN)

REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 9-227329, A (M & M Kenkyusho K.K.), 02 September, 1997 (02.09.97), page 8, Column 14, line 19 to page 10, Column 18, line 26 (Family: none)	1-19
X	JP, 6-343451, A (Yamato KUBOTA), 20 December, 1994 (20.12.94), page 8, Column 14, line 41 to page 11, Column 20, line 12 (Family: none)	1-19
X	JP, 6-245988, A (Yamato KUBOTA), 06 September, 1994 (06.09.94), page 7, Column 11, line 33 to page 9, Column 16, line 7 (Family: none)	1-19
X	JP, 6-153928, A (Yamato KUBOTA), 03 June, 1994 (03.06.94), page 5, Column 8, line 40 to page 8, Column 13, line 8 (Family: none)	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 04 June, 2001 (04.06.01)	Date of mailing of the international search report 19 June, 2001 (19.06.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02241

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 6-141851, A (Yamato KUBOTA), 24 May, 1994 (24.05.94), page 5, Column 8, line 50 to page 7, Column 11, line 33 (Family: none)	1-19
Y	JP, 11-169703, A (M & M Kenkyusho K.K.), 29 June, 1999 (29.06.99), page 2, Column 1, line 1 to Column 2, line 11 (Family: none)	1-19
Y	JP, 5-84290, A (Terumo Corporation), 06 April, 1993 (06.04.93), page 2, Column 2, line 42 to page 4, Column 6, line 7 (Family: none)	1-19
Y	EP, 386960, A2 (American Cyanamid Company), 12 September, 1990 (12.09.90), page 10, line 41 to page 25, line 23 & FI, 901102, A & JP, 2-300114, A & CA, 2011423, A & AU, 632539, B & GB, 2229443, A	1-19
Y	JP, 6-116169, A (Res. Dev Corp. of Japan.), 26 April, 1994 (26.04.94), page 2, Column 2, line 44 to page 3, Column 3, line 26; page 6, Column 9, line 46 to page 7, Column 12, line 42 (Family: none)	1-19
Y	JP, 5-262882, A (W R Grace & Co-Conn), 12 October, 1993 (12.10.93), page 2, Column 2, line 1 to page 4, Column 6, line 1 (Family: none)	1-19



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A01N1/02, C12N5/00, G01N33/48, G01N1/28

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> A01N1/02, C12N5/00, G01N33/48, G01N1/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 9-227329, A (株式会社エムアンドエム研究所), 2. 9月. 1997 (02. 09. 97) 第8頁第14欄第19行-第10頁第18欄第26行 (ファミリーなし)	1-19
X	JP, 6-343451, A (窪田俊), 20. 12月. 1994 (20. 12. 94) 第8頁第14欄第41行-第11頁第20欄第12行 (ファミリーなし)	1-19
X	JP, 6-245988, A (窪田俊), 6. 9月. 1994 (06. 09. 94) 第7頁第11欄第33行-第9頁第16欄第7行 (ファミリーなし)	1-19
X	JP, 6-153928, A (窪田俊), 3. 6月. 1994 (03. 06. 94) 第5頁第8欄第40行-第8頁第13欄	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 06. 01

国際調査報告の発送日

19.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

守安 智

4H

9837

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	第8行 (ファミリーなし)	
X	JP, 6-141851, A (窪田倭), 24. 5月. 1994 (24. 05. 94) 第5頁第8欄第50行-第7頁第11欄第33行 (ファミリーなし)	1-19
Y	JP, 11-169703, A (株式会社エムアンドエム研究所), 29. 6月. 1999 (29. 06. 99) 第2頁第1欄第1行-第2欄第11行 (ファミリーなし)	1-19
Y	JP, 5-84290, A (テルモ株式会社), 6. 4月. 1993 (06. 04. 93) 第2頁第2欄第42行-第4頁第6欄第7行 (ファミリーなし)	1-19
Y	EP, 386960, A2 (American Cyanamid Company), 12. 9月. 1990 (12. 09. 90) 第10頁第41行-第25頁第23行 & FI, 901102, A & JP, 2-300114, A & CA, 201 1423, A & AU, 632539, B & GB, 2229443, A	1-19
Y	JP, 6-116169, A (新技術事業団), 26. 4月. 1994 (26. 04. 94) 第2頁第2欄第44行-第3頁第3欄第26行、第6頁第9欄第46行-第7頁第12欄第42行 (ファミリーなし)	1-19
Y	JP, 5-262882, A (W R Grace & Co-Conn), 12. 10月. 1993 (12. 10. 93) 第2頁第2欄第1行-第4頁第6欄第1行 (ファミリーなし)	1-19